



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1643
Examiner : Karen A. Canella
Serial No. : 09/503,089
Filed : February 11, 2000
Inventors : Amanda J. Patel
: Eric Honore
: Florian LeSage
: Georges Romey
: Michel Lazduski
: Michel Fink
: Fabrice Duprat
: François Maingret
Title : METHOD FOR THE
: IDENTIFICATION OF
: ANESTHETICS

Customer No.: 035811

Docket: 1201-CIP3-00

Confirmation No.: 6089

Not. Of Allow.: 05/11/06

Date: August 7, 2006

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Mail Stop Issue Fee
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

We submit herewith the certified copy of French Patent Application No. 96/01565, filed February 8, 1996, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC/cc
(215) 656-3381

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE CERTIFIÉE CONFORME

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le titre de propriété industrielle, correspondant à la demande ci-annexée, a été délivré le 17 avril 1998

Fait à Paris le 13 JUIL. 2006

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE *

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

DATE DE REMISE DES PIÈCES

08-02-96

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 01565 -

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

08/02/1996

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRE
DU RAPPORT DE RECHERCHE *

☐ OUI
☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI
☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

F17B12FR

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

47 03 67 77

7 TITRE DE L'INVENTION

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMMIFERE, LEUR CLONAGE ET LEUR
UTILISATION NOTAMMENT POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES.

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN.

Centre National de la Recherche Scientifique -CNRS-

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

3, rue Michel Ange
75015 PARIS

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANCAISE

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *

☐ OUI
☒ NON

Si la réponse est non voir notice explicative

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*

☐ OUI
☐ NON

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

☒ DE REVENDICATION (à partir de la 11è)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE-N° D'INSCRIPTION

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

Pierre BREESE
921038

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30 F17B12FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96/01565

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMIFERE, LEUR CLONAGE ET LEUR
UTILISATION NOTAMMENT POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES.

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

BREESE-MAJEROWICZ
3, avenue de l'Opéra
75001 PARIS

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

LESAGE Florian
12, avenue Auber 06100 NICE

GUILLEMARE Eric
1, avenue Aristide Briand 06100 NICE

FINK Michel
Les Amaryllis B2 5, chemin des Gourguettes 06150 CANNES LA BOCCA

DUPRAT Fabrice
n°1 les Tamaris Avenue Henri Barbusse 06220 VALLAURIS

LAZDUNSKI Michel
21, avenue Colombo 06100 NICE

ROMEY Georges
61 bis, Corniche Fleurie Géraniums 06200 NICE

BARHANIN Jacques
L'Astrid Avenue du Roi Albert 1er 06100 NICE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 06 Novembre 1996

Pierre BREESE
921038

NOUVELLE FAMILLE DE CANAUX POTASSIUM DE MAMMIFÈRE, LEUR CLONAGE ET LEUR UTILISATION NOTAMMENT POUR LE CRIBLAGE DE DROGUES.

La présente invention concerne une nouvelle famille de canaux potassium. Elle concerne plus particulièrement le clonage d'un canal potassium humain qui constitue le premier membre d'une nouveau groupe fonctionnel et structurel de canaux potassium. L'abondance de ce canal et sa présence dans un grand nombre de tissus sont de nature à lui conférer un rôle primordial dans le transport du potassium chez un grand nombre de types cellulaires.

Les canaux potassium sont ubiquitaires chez les cellules eucaryotes et procaryotes. Leur exceptionnelle diversité fonctionnelle en font des candidats idéals pour un grand nombre de processus biologiques dans les cellules vivantes (Rudy, B., 1988, *Neurosciences*, 25, 729-749 ; Hille, B., 1992, *"Ionic Channels of Excitable Membrane"*, 2nd edn, Sinauer, Sunderland, Massachussetts). Chez les cellules excitables, les canaux K^+ définissent la forme des potentiels d'action et la fréquence de l'activité électrique, et joue un rôle majeur dans l'intégration neuronale, la contraction musculaire ou la sécrétion hormonale. Chez les cellules non-excitables, leur expression semble être corrélée à des stades spécifiques du développement de la cellule (Barres, B. A. et al., 1990, *Annu. Rev. Neurosci.*, 13, 441-474). Chez la plupart des cellules, des types particuliers de canaux K^+ jouent un rôle vital pour déterminer le potentiel électrique de la membrane au repos en réglant la perméabilité membranaire aux ions K^+ . Ces canaux

présentent la particularité d'être instantanés et ouverts dans un large gamme de potentiels membranaires.

Des travaux de clonage récents ont permis d'identifier un grand nombre de sous-unités capables de former de canaux potassium (Betz, H., 1990, *Biochemistry*, 29, 3591-3599 ; Pngs, O., 1992, *Physiol. Rev.*, 72, S69-88 ; Salkoff, L. et al., 1992, *Trends Neurosci.*, 15, 161-166 ; Jan, L. Y. and Y. N. Jan, 1994, *Nature*, 371, 119-122 ; Doupnik, C. A. et al., 1995, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, 268-277) qui pourraient être régulés par d'autres types de sous-unités (Aldrich, R. W., 1994, *Curr. Biol.*, 4, 839-840 ; Isom, L. L. et al., 1994, *Neuron*, 12, 1183-1194 ; Rettig, J. et al., 1994, *Nature*, 369, 289-294 ; Attali, B. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6092-6096).

Les sous-unités des canaux K^+ voltage-dépendants activés par dépolarisation (familles Kv) et des canaux K^+ calcium-dépendant présentent six domaines transmembranaires hydrophobes, dont l'un (S4) contient des charges positives répétées qui confèrent à ces canaux leur sensibilité au voltage et en conséquence dans leur rectification sortante fonctionnelle (Logothetis, D. E. et al., 1992, *Neuron*, 8, 531-540 ; Bezanilla, F. et Stefani, E., 1994, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 819-846).

Les canaux K^+ avec une rectification entrante (Familles Kir) ont seulement deux domaines transmembranaires. Ils ne possèdent pas le segment S4 et la rectification entrante résulte d'un blocage voltage-dépendant par le magnésium cytoplasmique (Matsuda, H, 1991, *Annu. Rev. Physiol.*, 53, 289-298 ; Lu, Z. et Mackinnon, R., 1994, *Nature*, 371, 243-246 ; Nichols, C. G. et al., 1994, *J. Physiol. London*, 476, 399-409).

Un motif structural commun, dénommé domaine P, est rencontré dans les deux groupes, et constitue un élément essentiel de la structure du pore perméable au K^+ .

La présence de ce motif dans une protéine membranaire est considéré comme la signature de la structure d'un canal K^+ (Pongs, O., 1993, *J. Membrane Biol.*, 136, 1-8 ; Heginbotham, L. et al., 1994, *Biophys. J.*, 66, 1061-1067 ; Mackinnon, R. 1995, *Neuron*, 14, 889-892 ; Pascual, J. M. et al., 1995, *Neuron*, 14, 1055-1063).

La présente invention est fondé sur le clonage d'un canal K^+ qui est le premier membre d'une nouveau groupe structurel et fonctionnel de canaux potassium. Ce nouveau canal K^+ a une nouvelle architecture moléculaire avec quatre segments trans-membranaire et deux domaine P. D'un point de vue fonctionnel, ce canal est remarquable en ce qu'il présente des propriétés de rectification entrante peu marquées. Ce nouveau canal est dénommé, dans ce qui suit, TWIK-1, pour désigner la terminologie anglaise "Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K^+ channel". Son abondance et sa présence dans un grand nombre de tissus sont de nature à lui conférer un rôle primordial dans le transport du potassium chez un grand nombre de types cellulaires.

La mise en évidence de cette nouvelle famille de canaux potassium et le clonage d'un membre de cette famille permet notamment de disposer de nouveaux moyens de criblages de drogues capables de moduler l'activité de ces nouveaux canaux potassium et donc de prévenir ou traiter des maladies impliquant ces canaux.

Le travail de recherche ayant mené au clonage du canal TWIK-1 a été conduit de la manière décrite ci-après, où il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

- SEQ ID NO : 1 représente la séquence la séquence nucléotidique de l'ADNc de TWIK-1 et la séquence en acides aminés de la séquence codante.

- SEQ ID NO : 2 représente la séquence en acides aminés de la protéine TWIK-1.

- La figure 1 représente l'analyse en Northern blot, les séquences en nucléotides et la séquence déduite en acides aminés, ainsi que le profile d'hydrophobicité de TWIK-1. (a) : expression de l'ARNm de TWIK-1 dans des tissus humains; chaque voie contient 5 µg de poly(A)⁺; l'autoradiogramme a été exposé 24 heures. (b) : séquence de l'ADNc de TWIK-1 et la séquences en acides aminés de la séquence codante. Les segments supposés trans-membranaires sont encadrés et les domaines P sont soulignés; o, représente un site potentiel de glycosilation, et ■ représente le résidu thréonine dans lesite consensus de reconnaissance de la protéine kinase C. (c) : l'analyse d'hydrophobicité et la topologie de TWIK-1 qui en est déduite; les valeurs d'hydrophobicité ont été calculées conformément à la méthode de Kyte et Doolittle (taille de la fenêtre de 11 acides aminés) et sont rapportées vis-à-vis de la position de l'acide aminé; les pics hydrophobes ombrés correspondent aux segments trans-membranaires.

- La figure 2 représente les alignements de séquences. (a) : alignement des domaines P de TWIK-1, TOC/YORK, et d'autres familles de canaux K⁺ représentatives; les résidus identiques et conservés sont encadrés respectivement en noir et en gris. (b) : alignement de TWIK-1 avec des homologues potentiels de *C. elegans*; les séquences M110.2 et F17C8.5 ont été déduites des séquences des gènes (numéros d'accès respectifs Z49968 et Z35719); l'épissage informatisé des autres séquences génomique de *C. elegans* (numéros d'accès Z49889, P34411 et Z22180) n'est pas suffisamment précis pour permettre leur alignement parfait et n'est donc pas représenté.

- La figure 3 montre les propriétés biophysiques et pharmacologiques de courants K⁺

enregistrés par la technique de voltage-imposé sur des oocytes de *Xenopus* ayant reçus une injection d'ARNc de TWIK-1; (a) : l'oocyte a été maintenu à un potentiel de maintien (HP) de -80 mV et les courants ont été enregistrés à la suite de sauts de voltage de 1-s de -120 à + 60 mV par incrément de 20 mV. (b) : relation régulière courant-voltage, selon la même expérience qu'en (a). (c) : renversement de potentiel des courants de TWIK-1 (E_{rev}) en fonction de la concentration externe en K^+ . (d) : traces de courants liées à des dépolarisations de +30 mV à partir d'un potentiel maintenu (HP) de -80 mV en l'absence (trace supérieur) et en présence (trace inférieur) de 1 mM de Ba^{2+} . (e) : effet bloquant de 100 μM de quinine, même protocole qu'en (d). (f) : relation dose-réponse du blocage des courants de TWIK-1 par la quinine.

- La figure 4 montre l'influence de l'expression de TWIK-1 sur le potentiel membranaire. (a) : relations dose-réponse de l'ARNc; rangé du haut = état d'équilibre des courants sortants mesurés à +30 mV; rangée du bas = potentiels membranaires associés au repos. (b) : effet de 100 μM de quinine sur le potentiel membranaire d'un oocyte n'ayant pas reçu d'injection (trace de gauche) et d'un oocyte ayant reçu 20 ng d'ARNc de TWIK-1. (c) : traitement statistique des effets dépolarisants de 100 μM de quinine sur des oocytes n'ayant pas reçus d'injection (barres de gauche) et sur des oocytes ayant reçus une injection de 20 ng d'ARNc de TWIK-1 (barres de droite); contrôle (barre ouverte), + quinine (barres solides); chaque barre représente la moyenne \pm SD de 5 oocytes.

- La figure 5 montre les propriétés de de canal unique de TWIK-1. (a) : traces de courants enregistrées dans la configuration entrée-sortie aux potentiels de membrane indiqués en l'absence (m) ou en présence (•) de Mg^{2+} interne (3 mM) et en symétrie de

140 mM de K^+ . (b) : moyenne des courbes I-V ($n = 10$). (c et d) : temps ouvert de distribution obtenues à + 80 mV (histogrammes du haut) et à -80mV (histogrammes du bas) en présence of 3 mM Mg^{2+} (c) ou en l'absence de Mg^{2+} (d).

- La figure 6 montre le blocage des canaux TWIK-1 par le pH interne. (a et b) : effet bloquant de l'acidification interne sur les courants TWIK-1, induite par perfusion de CO_2 ; (a) : traces de courants superimposés provoqués par une phase de dépolarization à -30 mV à partir de HP = -80 mV, contrôle (trace supérieure), effet quand l'équilibre est atteint en présence de CO_2 (trace inférieure); (b) : graphe ($n = 5$) montrant le blocage presque complet des courants de TWIK-1 induit par du CO_2 ; (c et d) : acidification interne induite par l'application de DNP (1 mM). (c) : même protocole qu'en (a), contrôle (trace supérieure) et après 5 minutes d'application du DNP (trace inférieure); (d) : graphe ($n = 4$) indiquant le pourcentage de courant TWIK-1 restant après traitement par le DNP. (e et f) : voltage imposé (mode : patch attaché) dans des conditions symétriques de concentration en K^+ (140 mM) maintenu à +80 mV. (e) déroulement dans le temps de l'effet de 1 mM de DNP (fléché) sur les activités de canal unique de TWIK-1. (f) : graphe ($n = 4$) montrant l'effet du DNP sur la probabilité moyenne d'ouverture NP_o calculé pendant 1 minute d'enregistrement à partir de l'état d'équilibre. (g) : activités mesurées dans la configuration "patch-inside-out" à + 80 mV à différent pH interne. Graphe de barres ($n = 10$) de NP_o en fonction du pH interne.

- La figure 7 montre l'activation des canaux TWIK-1 par le PMA, activateur de la protéine kinase C. (a) : perfusion pendant 10 minutes de PMA (30 nM) augmente le courant TWIK-1 (trace supérieure) provoqué par une phase de dépolarisation à +30 mV à partir de HP = -80 mV, courant de contrôle (trace inférieure). (b) graphe ($n = 5$)

montrant l'effet d'activation du PMA sur les courants TWIK-1. (c et d) : configuration "patch" attaché en conditions de concentrations en K^+ symétriques maintenu à +60 mV; (c) : déroulement dans le temps de l'effet de 30 nM de PMA sur les activités de canal unique; les enregistrements de l'activité du canal sont effectués avec un balayage rapide avant et après l'application du PMA; (d) : graphe de barres ($n = 5$) montrant l'effet d'activation du PMA sur NP_0 .

Les domaines P de canaux K^+ ont été utilisés pour rechercher de séquences correspondantes dans la banque de données GenBank en mettant en oeuvre le programme d'alignement de séquence BLAST (Altschul, S. F., et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410). Il a été ainsi identifié une séquence exprimée Tag humaine (EST, HSC3AH031) de 298 pb dont la séquence déduite en acides aminés comprend une séquence de domaine "P-like" non conventionnelle : GLG au lieu de GYG comme montré à la figure 2a. Il a été envisagé alors que cette séquence EST était une copie partielle d'un ARNm codant un nouveau type de sous-unité de canal K^+ . Une sonde d'ADN a été préparée à partir de cette séquence afin de réaliser une hybridation avec un Northern blot (Clontech) de tissus multiples humains. Un transcrit de 1,9 kb a ainsi été abondamment trouvé, comme montre à la figure 1a, dans le coeur et le cerveau et, à un niveau moindre, dans le placenta, le poumon, le foi et le rein. La sonde d'ADN a été utilisée pour cribler une banque d'ADNc de rein et quatre clones indépendants ont été obtenus. Les inserts d'ADNc de 1,8 à 1,9 kb de ces clones comportent tous le même cadre de lecture ouvert (ORF) contenant une région identique à la séquence de 298 pb de HSC3AH031 et différent seulement par la longueur de leurs séquences 5' non codantes.

Structure primaire de TWIK-1.

Les caractéristiques suivantes ont été mise en évidence :

- Les séquences des clones d'ADNc contiennent un ORF de 1011 nucléotides codant pour un polypeptide de 336 acides aminés représenté à la figure 1b.
- Cette protéine comporte deux domaines P.
- En dehors des domaines P, aucun alignement significatif n'a été observé entre TWIK-1 et un canal K⁺ récemment cloné chez la levure et qui comporte également deux domaines P (Ketchum, K. A. et al, 1995, *Nature*, 376, 690-695).
- L'analyse d'hydrophobicité de TWIK-1, représenté à la figure 1c, révèle la présence de quatre domaines trans-membranaires, désignés T1 à T4.
- En plaçant l'extrémité NH₂ sur la face cytoplasmique, conformément à l'absence de peptide signal, on obtient le modèle de topologie représenté à la figure 1c.
- Dans ce modèle, les deux domaines P sont insérés dans la membrane depuis l'extérieur conformément à l'orientation connue de ces boucles dans les canaux K⁺.
- En outre, le motif structural général de TWIK-1 est similaire au motif que l'on obtiendrait en faisant un tandem de deux sous-unités classiques rectifiant l'entrée d'un canal potassium. Comme un rectificateur entrant classique, TWIK-1 ne présente pas le segment hautement conservé S4 qui est responsable de la sensibilité au potentiel de membrane de la rectification entrante des canaux K⁺ de la famille Kv.
- Une large boucle non habituelle de 59 acides aminés est présente entre M1 et P1, de manière à étendre la longueur du linker M1-P1 du côté extracellulaire de la membrane.

- Un site de N-glycosilation potentiel est présent dans cette boucle.

- Trois sites consensus de phosphorylation sont présents aux extrémités N-terminale (Ser 19 pour la calcium calmodulin kinase II) et C-terminale (Ser 303 pour la caséine kinase II) des domaines cytoplasmiques, et dans le linker M2-M3 (Thr161 pour la protéine kinase II).

- L'alignement des domaines P d'un groupe important de canaux K^+ est donné à la figure 2a. Il montre que les régions constituant le pore sélectif au K^+ sont bien conservées incluant le résidu G en position 16 et 18 et trois autres résidus indiquant des changements pratiquement exclusivement conservatifs aux positions 7, 14 et 17. De façon intéressante, un résidu leucine est présent à la place d'une tyrosine conservée en position 17 dans le domaine P2 de TWIK-1, ou d'un phénylalanine en position 17 dans le domaine P du canal K^+ de type eag.

Les homologues de TWIK-1.

La comparaison de la séquence complète de TWIK-1 avec des séquences de la base de données Genbank a permis d'identifier au moins cinq gènes de *Caenorhabditis elegans* qui ont été caractérisés dans le cadre du projet de Séquençage Nematode, et qui potentiellement code pour des homologues structuraux de TWIK-1. L'alignement de deux d'entre-eux avec TWIK-1 est représenté à la figure 2b. Les homologues de séquences totales entre les protéines déduites de *C. elegans* et TWIK-1 sont d'environ 55 à 60 % et environ 25 à 28 % d'identité. Les homologues entre séquences de *C. elegans* ne sont pas supérieures.

Expression fonctionnelle de TWIK-1.

Pour l'étude fonctionnelle, la séquence codante de TWIK-1 a été insérée entre les séquences non-codantes 5' et 3' de *Xenopus* globin dans le vecteur pEXO

(Lingueglia, E. et al., 1993, *J. Biol. Chem.*, 269, 13736-13739). Un ARN complémentaire (ARNc) a été transcrit de cette construction et injecté dans des oocytes de *X. laevis*. Un courant non-inactivant, absent des cellules non-injectées, a été mesuré par la technique de voltage imposé, comme représenté à la figure 3a. L'activation cinétique du courant est le plus souvent instantanée et ne peut pas être résolue car elle est masquée par la décharge capacitive du courant enregistré au début de l'impulsion. La relation courant-voltage est linéaire au-dessus de 0mV puis sature pour une dépolarisation plus forte de la membrane, comme montré à la figure 3b. TWIK-1 est donc K⁺ sélectif. Dans le cas d'une substitution du K⁺ externe par du Na⁺ ou par du N-méthyle D-gluconate, le renversement du potentiel des courants suit le potentiel d'équilibre K⁺ (E_K), comme représenté à la figure 3c. En outre, un changement par 10 de la concentration [(K)]_o conduit à un changement de 56 ± 2 mV de la valeur d'inversion du potentiel, conformément à l'équation de Nernst.

Comme montré à la figure 3, les courants K⁺ de TWIK-1 sont inhibés par Ba²⁺ (figure 3d) avec une valeur IC₅₀ de 100 µM, par la quinine (figure 3e et 3f) et par la quinidine (non représenté) avec des valeurs IC₅₀ respectivement de 50 et 95 µM. Les courants TWIK-1 sont légèrement sensible au TEA et au tedisamil anti-arythmique de classe III (30 % d'inhibition pour chacun, respectivement à 10 mM et 100 µM). Moins de 10 % d'inhibition ont été observés après application de 4-aminopyridine (1 mM), d'apamine (0,3 µM), de charybdotoxine (3 nM), de dedrotoxine (0, 1 µM), de clofilium (30 µM), d'amiodarone (100 µM) et de glibenclamide (30 µM). Le canal TWIK-1 n'est pas sensible aux ouvreurs de canal K⁺ que sont la cromakaline (100 µM) et le pinacidil (100 µM).

La figure 4 montre l'effet de l'augmentation des doses injectées d'ARNc de TWIK-1 sur l'expression indépendante du temps des courants K^+ et sur le repos du potentiel membranaire (E_m). Dès que le courant apparaît, les oocytes deviennent davantage polarisés, pour atteindre une valeur de E_m proche de E_K . L'amplitude du courant de TWIK-1 atteint des valeurs de 0,6 à 0,8 μA pour l'injection de 20 ng par oocyte. Des doses supérieures d'ARNc de TWIK-1 sont toxiques conduisant à une baisse de l'expression. Dans les oocytes ayant reçus 20 ng d'ARNc, la quinine qui est le meilleur bloquant de TWIK-1, induit une importante dépolarisation réversible (73 ± 6 mV, $n = 5$) comme montré aux figures 4 b et 4c.

Les propriétés unitaires du canal TWIK-1.

Les enregistrements de canal simple de courants, représentés à la figure 5, dans une configuration de patch de type "inside-out" ou dans une configuration de cellule entière montre que les canaux TWIK-1 assurent le passage de courants sortant ou entrant en fonction, respectivement, d'une dépolarisation ou d'une hyperpolarisation (figure 5a). La relation courant-voltage du canal unique, représentée à la figure 5b, montre une rectification entrante peu accentuée en présence de 3 mM (figure 5) et 10 mM (non représenté) de Mg^{2+} du côté cytoplasmique. Comme montré à la figure 5b, cette rectification disparaît en l'absence de Mg^{2+} interne. Dans 3 mM de Mg^{2+} interne, la durée moyenne d'ouverture à +80 mV est de 1,9 ms et la conductance unitaire de 19 ± 1 pS (figure 5c). A -80 mV, les canaux sont vacillants avec une durée moyenne d'ouverture de 0,3 ms, et une valeur de conductance en augmentation à 34 ± 4 pS. Le retrait des ions Mg^{2+} internes n'influence pas les paramètres cinétiques à la fois dans les conditions polarisées et dépolarisées, mais la conductance unitaire

mesurée à -80 mV atteint 35 ± 4 pS. Cette augmentation apparente de la conductance dans le canal unique suggère que c'est la vacillance extrêmement rapide induite par Mg^{2+} qui conduit à une sous-estimation de la valeur réelle de la conductance. Les mêmes propriétés ont été observées dans la configuration de cellule fixée montrant que le comportement du canal n'est pas modifié par une excision du patch. Les canaux TWIK-1 dans des patch excisés ne se décharge pas et semble pas nécessiter de constituants intra-cellulaires. Contrairement à de nombreux canaux qui nécessitent la présence d'ATP, pour leur activité dans la configuration de patch excisé, l'ATP n'est pas nécessaire à l'expression de TWIK-1. En outre, la perfusion du patch avec une solution contenant 10 mM d'ATP n'induit aucun effet sur l'activité du canal TWIK-1.

Les propriétés de régulation de l'activité du canal TWIK-1.

Le pH intracellulaire (Ph_i) est impliqué dans le contrôle de nombreux processus cellulaires, et dans des cellules comme les cellules hépatiques, les changements de Ph_i régulent le potentiel membranaire (Bear, C. E. et al., 1988, *Biochim. Biophys. Acta*, 944, 113-120).

L'acidification intracellulaire des oocytes a été obtenue selon deux méthodes :

- superfusion avec une solution enrichie en CO_2 qui produit une acidification par un mécanisme impliquant le système de transport de bicarbonate (Guillemare, E. et al., 1995, *Mol. Pharmacol.*, 47, 588-594);

- traitement avec le dinitrophénol (DNP), qui est un inhibiteur métabolique découplant le gradient de H^+ dans les mitochondries et qui induit une acidité interne (Pedersen, P. L. et Carafoli, E., 1987, *Trends Biol. Sci.*, 12, 146-189).

Ces deux expérimentations ont conduit à une réduction significative des courants de TWIK-1, supérieur à 95 % dans le cas de CO_2 et 80 % dans le cas du DNP, des valeurs de contrôle de l'amplitude, comme montré aux figures 6a à 6d. L'inhibition induite par le DNP sur l'activité du canal unique K^+ a encore été observée dans des conditions de patch attaché, comme montré aux figures 6e à 6f. Toutefois, après excision du patch, l'activité du canal devient insensible à l'acidification de la solution interne obtenue, soit en modifiant le rapport de tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (figures 6g et 6h), soit par bouillonnement de CO_2 (non représenté). EN conséquence, l'effet du pH sur l'activité du canal TWIK-1 est probablement indirect.

La phosphorylation ou la déphosphorylation de résidus d'acide aminés spécifiques est un important mécanisme de régulation des canaux ioniques (Levitan, I. B., 1994, *Annu. Rev. Physiol.*, 56, 193-212). Comme montré à la figure 7, l'activation de la protéine kinase C par le phorbol-12 myristate acétate (PMA, 30 nM) augmente les courants de TWIK-1. Le phorbol ester 4 α -phorbol-12, 13 didécanoate inactif (PDA, 1 μM) n'a aucun effet. Dans un patch attaché qui initialement exprimait uniquement un canal, l'application du PMA la présence d'au moins cinq canaux (figures 7c et 7d). Cette expérience montre que au moins quatre canaux sont présents mais silencieux dans ce patch avant l'application de PMA. Du fait que la séquence de TWIK-1 contient un site de phosphorylation consensus pour la protéine kinase C (PKC), localisé au niveau de la thréonine en position 161 (figure 1b), l'effet du PMA laisse supposer une régulation sous le contrôle de PKC. Toutefois, la mutation de la thréonine 161 en alanine conduit à un canal muté qui demeure fonctionnel et conserve la capacité d'être activé par le PMA.

L'activation de la protéine kinase A par application de 8-Cl-AMPC (300 μM) ou de forskolin (10 μM) n'affecte pas l'activité de TWIK-1. L'élévation de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique par application de A23187 (1 μM), qui pourrait avoir activé la Ca^{2+} -calmoduline kinase II et/ou révélé la présence d'un canal activé par le Ca^{2+} , est aussi sans effet sur les propriétés du canal TWIK-1.

La présente invention a donc pour objet une molécule d'acide nucléique isolée et purifiée codant pour une protéine constituant un canal potassium TWIK-1 ou présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 décrite ci-dessus.

Plus particulièrement, ladite molécule d'acide nucléique code pour la protéine TWIK-1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2, ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette séquence. De tels dérivés peuvent être obtenus en modifiant et/ou en supprimant un ou plusieurs résidus d'acides aminés de cette séquence, dès lors que cette modification et/ou suppression ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de canal potassium TWIK-1 de la protéine en résultant.

La séquence d'une molécule d'ADN codant pour cette protéine est plus particulièrement celle codant pour TWIK-1 représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1.

L'invention concerne également un vecteur comprenant une molécule d'acide nucléique précédente, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal potassium TWIK-1 ou un canal de la même famille que TWIK-1.

Un procédé de production d'une protéine constituant un canal potassium TWIK-1 ou présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,
- à cultiver l'hôte cellulaire obtenu à l'étape précédente dans des conditions permettant la production de canaux potassium présentant les propriétés de TWIK-1,
- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant des canaux potassium de la famille de TWIK-1.

Un procédé d'expression d'un canal potassium TWIK-1 ou de la même famille que TWIK-1 consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,
- à cultiver l'hôte cellulaire obtenu à l'étape précédente dans des conditions permettant l'expression de canaux potassium de la famille de TWIK-1.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré, il peut s'agir de tout vecteur comme un plasmide.

L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 obtenues conformément aux procédés précédents.

Les cellules exprimant des canaux potassium TWIK-1 ou des canaux présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 obtenues conformément aux procédés précédents, sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler l'activité des canaux potassium TWIK-1. Ce criblage est effectué en mettant en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant le canal TWIK-1 ou des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1, puis en mesurant, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux potassium de ces canaux.

Ce procédé de criblage permet d'identifier des drogues utiles dans le traitement des maladies du coeur ou du système nerveux. Des pathologies impliquant les canaux potassium et donc susceptible de concerner les canaux de la famille de TWIK-1 sont par exemple, l'épilepsie, les pathologies cardiaques (arythmies) et vasculaires, les neurodégénérescences particulièrement celles qui sont associées aux ischémies ou anoxies, les pathologies endocriniennes associées à des anomalies de sécrétion d'hormones, les pathologies musculaires.

Une molécule d'acide nucléique isolée et purifiée codant pour une protéine constituant un canal potassium TWIK-1 ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux potassium TWIK-1, sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux sur-exprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connus de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux TWIK-1.

Les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite molécule sont en outre susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une déficience des canaux potassium au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par ladite molécule pour le traitement de pathologie impliquant les canaux potassium.

En outre, le gène du canal TWIK-1 a été situé sur le chromosome 1 en position q42-q43. La localisation chromosomique de ce gène constitue un résultat déterminant pour l'identification de maladies génétiques associées à cette nouvelle famille de canaux potassium; ainsi, la connaissance de la structure des canaux de la famille de TWIK-1 est de nature à permettre la réalisation d'un diagnostic ante-natal de telles maladies.

La présente invention a encore pour objet une nouvelle famille de canaux K^+ , à laquelle appartient TWIK-1, présents dans la plupart des tissus humains et plus particulièrement abondant dans le cerveau et le coeur, et présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 décrites ci-dessus. Elle concerne donc une protéine isolée et purifiée dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2, ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette séquence.

De tels dérivés peuvent être obtenus en modifiant et/ou en supprimant un ou plusieurs résidus d'acides aminés de cette séquence ou en segmentant cette séquence, dès lors que cette modification et/ou suppression ou délétion d'un fragment ne modifie pas les propriétés

fonctionnelles de canal potassium du type TWIK-1, de la protéine en résultant.

Une protéine constituant un canal potassium du type TWIK-1 est utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des maladies impliquant un dysfonctionnement des canaux potassium.

Des anticorps poly ou mono-clonaux dirigés contre une protéine constituant un canal potassium du type TWIK-1 peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites dans la littérature.

Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence de canaux potassium de la famille de TWIK-1 dans différentes tissus humains ou nimaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, les canaux potassium du type TWIK-1.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatifs et concernant le clonage et l'expression de TWIK-1.

Identification de la séquence HSC3AH031 EST et analyse de l'ARN.

Les domaines P des canaux clonés ont été utilisés pour rechercher des homolhues dans des bases de données du NCBI (National Center of Biotechnology) en mettant en oeuvre le programme d'alignement de séquences tBLASTn. La traduction d'une séquence EST (HSC3AH031, numéro d'accès Genbank : F12504) présentait une similarité de séquence significative ($P = 1,2 \times 10^{-3}$) avec le second domaine P d'un canal K^+ de levure. Cette séquence de 298 pb a été originellement obtenue à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain dans le cadre du

programme d'ADNc Genexpress (Auffray, C. et al., 1995, C. R. Acad. Sci., III, Sci. Vie, 318, 263-272). Un fragment d'ADN de 255 pb correspondant à HSC3AH031 a été amplifié par PCR à partir d'ADNc dérivés de poly(A)⁺ de cerveau humain et sous-cloné dans pBluescript (Stratagene) pour donner pBS-HSC3A.

Pour l'analyse d'ARN, un Northern blot de tissus humains multiples (Clontech) a été criblé avec l'insert de pBS-HSCA marqué au p³² dans 50 % de formamide, 5 x SSPE (0,9 M NaCl ; 50 mM phosphate de sodium ; pH 7,4 ; 5 mM EDTA), 0,1 % SDS, 5 x Denhardt's, 20 mM phosphate de potassium, pH 6,5 et 250 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé à 55 °C pendant 18 heures. Les blots ont été lavés jusqu'à une stringence finale de 0,1 SSC (3 M NaCl ; 0,3 M citrate de sodium ; pH 7,0), 0,3 % SDS à 65 °C.

Isolement du clone d'ADNC codant TWIK-1.

Une banque d'ADNc oligo(dT) issu d'ARN poly(A)⁺ isolés de rein d'humain adulte a été criblée avec l'insert de pBS-HSCA marqué au p³². Les filtres ont été hybridés dans 50 % formamide, 5 x SSC, 4 X Denhardt, 0,1 % SDS et 100 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé à 50 °C pendant 18 heures. Quatre clones d'hybridation positive ont été isolés d'environ 5 x 10⁵ clones. Les phages λZAPII contenant les inserts d'ADNc ont été convertis en plasmides d'ADNc (Stratagene). Les inserts d'ADNc ont été caractérisés en analyse par des enzymes de restriction et par séquençage total ou partiel d'ADN sur les deux brins par la méthode des nucléotide didéoxy mettant en oeuvre un séquenceur automatique (Applied Biosystems 373A).

Mutations, synthèse d'ARNc et injection d'oocyte.

La séquence codante de TWIK-1 a été amplifiée en utilisant une ADN polymérase à faible taux d'erreur (Pwo DNA pol, Boehringer) et sous-clonée dans le plasmide pEXO pour donner le pEXO-TWIK-1. Les mutations ont été réalisées en amplifiant le plasmide pEXO-TWIK-1 en entier avec un kit PCR d'extension hautement fidèle (Boehringer) et deux amorces adjacentes. L'un d'entre-eux a introduit une mutation ponctuelle dans la séquence codante de TWIK-1 changeant le codon de la Thr 161 en un codon pour l'alanine. Le produit de la PCR a été linéarisé par l'enzyme BamHI et les ARNc ont été synthétisés en utilisant une T7 ARN polymérase (Stratagene). La préparation des oocytes de *X. laevis* et l'injection d'ARNc ont été réalisées comme décrit dans la littérature (Guillemare, E. et al., 1992, *Biochemistry*, 31, 12463-12468).

Mesures électrophysiologiques.

Dans une chambre à perfusion de 0,3 ml, un seul oocyte a été empalé sur deux micro-électrodes de verre standards (0,5 - 2,0 MW) chargées avec 3 M KCl et maintenues sous voltage-clamp avec un amplificateur Dagan TEV200. La solution du bain contenait 98 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ et 5 mM HEPES à pH 7,4 avec KOH. La stimulation de la préparation, l'acquisition des données et les analyses ont été réalisées avec le logiciel pClamp (Axon Instruments, USA).

Pour les expériences de patch-clamp, les oocytes ont été débarassés de leur membrane vitelline comme décrit dans la littérature (Duprat, F. et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 657-663) et placés dans une solution de bain contenant 140 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂ et 5 mM HEPES à pH 7,4 avec KOH. Les pipettes ont été remplies avec une solution forte de K⁺ (40 mM KCl, 100 mM de sulphonate méthane de

potassium, 1,8 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 et 5 mM HEPES ajusté à pH 7,4 avec KOH). 100 μM de GdCl_3 ont été ajoutés à la solution de pipette pour inhiber l'action des canaux activés. Les patch "inside-out" ont été perfusés avec une solution contenant 140 mM KCL, 10 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES ajusté à pH 7,2 avec KOH et 5 mM EGTA ajoutés journellement. Les signaux de canal unique ont été filtrés à 3,5 kHz et analysés avec le programme Biopatch (Bio-Logic, Grnoble, France)

LISTE DE SÉQUENCES.

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:1 :

I - CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR :

B) TYPE :

C) NOMBRE DE BRIN :

D) CONFIGURATION :

II - TYPE DE MOLECULE :

XI - DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO:1 :

GGGCAGGAAG ACGGCGCTGC CCGGAGGAGC GGGGCGGGCG GGCGCGCGGG GGAGCGGGCG	60
CGGGGCGGGGA GCCAGGCCCG GGCGGGGGCG GGGGCGGCGG GGCCAGAAGA GGCGGCGGGC	120
CGCGCTCCGG CCGGTCTGCG GCGTTGGCCT TGGCTTTGGC TTTGGCGGCG GCGGTGGAGA	180
AG ATG CTG CAG TCC CTG GCC GGC AGC TCG TGC GTG CGC CTG GTG GAG CGG Met Leu Gln Ser Leu Ala Gly Ser Ser Cys Val Arg Leu Val Glu Arg 1 5 10 15	230
CAC CGC TCG GCC TGG TGC TTC GGC TTC CTG GTG CTG GGC TAC TTG CTC His Arg Ser Ala Trp Cys Phe Gly Phe Leu Val Leu Gly Tyr Leu Leu 20 25 30	278
TAC CTG GTC TTC GGC GCA GTG GTC TTC TCC TCG GTG GAG CTG CCC TAT Tyr Leu Val Phe Gly Ala Val Val Phe Ser Ser Val Glu Leu Pro Tyr 35 40 45	326
GAG GAC CTG CTG CGC CAG GAG CTG CGC AAG CTG AAG CGA CGC TTC TTG Glu Asp Leu Leu Arg Gln Glu Leu Arg Lys Leu Lys Arg Arg Phe Leu 50 55 60	374
GAG GAG CAC GAG TGC CTG TCT GAG CAG CAG CTG GAG CAG TTC CTG GGC Glu Glu His Glu Cys Leu Ser Glu Gln Gln Leu Glu Gln Phe Leu Gly 65 70 75 80	422
CGG GTG CTG GAG GCC AGC AAC TAC GGC GTG TCG GTG CTC AGC AAC GCC Arg Val Leu Glu Ala Ser Asn Tyr Gly Val Ser Val Leu Ser Asn Ala 85 90 95	470
TCG GGC AAC TGG AAC TGG GAC TTC ACC TCC GCG CTC TTC TTC GCC AGC Ser Gly Asn Trp Asn Trp Asp Phe Thr Ser Ala Leu Phe Phe Ala Ser 100 105 110	518
ACC GTG CTC TCC ACC ACA GGT TAT GGC CAC ACC GTG CCC TTG TCA GAT Thr Val Leu Ser Thr Thr Gly Tyr Gly His Thr Val Pro Leu Ser Asp 115 120 125	566
GGA GGT AAG GCC TTC TGC ATC ATC TAC TCC GTC ATT GGC ATT CCC TTC Gly Gly Lys Ala Phe Cys Ile Ile Tyr Ser Val Ile Gly Ile Pro Phe 130 135 140	614

ACC CTC CTG TTC CTG ACG GCT GTG GTC CAG CGC ATC ACC GTG CAC GTC Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Val Val Gln Arg Ile Thr Val His Val 145 150 155 160	662
ACC CGC AGG CCG GTC CTC TAC TTC CAC ATC CGC TGG GGC TTC TCC AAG Thr Arg Arg Pro Val Leu Tyr Phe His Ile Arg Trp Gly Phe Ser Lys 165 170 175	710
CAG GTG GTG GCC ATC GTC CAT GCC GTG CTC CTT GGG TTT GTC ACT GTG Gln Val Val Ala Ile Val His Ala Val Leu Leu Gly Phe Val Thr Val 180 185 190	758
TCC TGC TTC TTC TTC ATC CCG GCC GCT GTC TTC TCA GTC CTG GAG GAT Ser Cys Phe Phe Phe Ile Pro Ala Ala Val Phe Ser Val Leu Glu Asp 195 200 205	806
GAC TGG AAC TTC CTG GAA TCC TTT TAT TTT TGT TTT ATT TCC CTG AGC Asp Trp Asn Phe Leu Glu Ser Phe Tyr Phe Cys Phe Ile Ser Leu Ser 210 215 220	854
ACC ATT GGC CTG GGG GAT TAT GTG CCT GGG GAA GGC TAC AAT CAA AAA Thr Ile Gly Leu Gly Asp Tyr Val Pro Gly Glu Gly Tyr Asn Gln Lys 225 230 235 240	902
TTC AGA GAG CTC TAT AAG ATT GGG ATC ACG TGT TAC CTG CTA CTT GGC Phe Arg Glu Leu Tyr Lys Ile Gly Ile Thr Cys Tyr Leu Leu Leu Gly 245 250 255	950
CTT ATT GCC ATG TTG GTA GTT CTG GAA ACC TTC TGT GAA CTC CAT GAG Leu Ile Ala Met Leu Val Val Leu Glu Thr Phe Cys Glu Leu His Glu 260 265 270	998
CTG AAA AAA TTC AGA AAA ATG TTC TAT GTG AAG AAG GAC AAG GAC GAG Leu Lys Lys Phe Arg Lys Met Phe Tyr Val Lys Lys Asp Lys Asp Glu 275 280 285	1046
GAT CAG GTG CAC ATC ATA GAG CAT GAC CAA CTG TCC TTC TCC TCG ATC Asp Gln Val His Ile Ile Glu His Asp Gln Leu Ser Phe Ser Ser Ile 290 295 300	1094
ACA GAC CAG GCA GCT GGC ATG AAA GAG GAC CAG AAG CAA AAT GAG CCT Thr Asp Gln Ala Ala Gly Met Lys Glu Asp Gln Lys Gln Asn Glu Pro 305 310 315 320	1142
TTT GTG GCC ACC CAG TCA TCT GCC TGC GTG GAT GGC CCT GCA AAC CAT Phe Val Ala Thr Gln Ser Ser Ala Cys Val Asp Gly Pro Ala Asn His 325 330 336	1190
TGA GCGTAGGATT TGTTGCATTA TGCTAGAGCA CCAGGGTCAG GGTGCAAGGA *	1243
AGAGGCTTAA GTATGTTTCAT TTTTATCAGA ATGCAAAAGC GAAAATTATG TCACTTTAAG	1303
AAATAGCTAC TGTTTGCAAT GTCTTATTAA AAAACAACAA AAAAAGACAC ATGGAACAAA	1363
GAAGCTGTGA CCCCAGCAGG ATGTCTAATA TGTGAGGAAA TGAGATGTCC ACCTAAAATT	1423

CATATGTGAC AAAATTATCT CGACCTTACA TAGGAGGAGA ATACTTGAAG CAGTATGCTG	1483
CTGTGGTTAG AAGCAGATTT TATACTTTTA ACTGGAAACT TTGGGGTTTG CATTTAGATC	1543
ATTTAGCTGA TGGCTAAATA GCAAAATTTA TATTTAGAAG CAAAAAAAAA AAGCATAGAG	1603
ATGTGTTTTA TAAATAGGTT TATGTGTACT GGTTTGCATG TACCCACCCA AAATGATTAT	1663
TTTTGGAGAA TCTAAGTCAA ACTCACTATT TATAATGCAT AGGTAACCAT TAACTATGTA	1723
CATATAAAGT ATAAATATGT TTATATTCTG TACATATGGT TTAGGTCACC AGATCCTAGT	1783
GTAGTTCTGA AACTAAGACT ATAGATATTT TGTTTCTTTT GATTTCTCTT TATACTAAAG	1843
AATCCAGAGT TGCTACAATA AAATAAGGGG AATAATAAAA AAAAAAAAAA A	1894

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO :2

I - CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- A) LONGUEUR :
- B) TYPE :
- C) NOMBRE DE BRIN :
- D) CONFIGURATION :

II - TYPE DE MOLECULE :

XI - DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:2 :

Met	Leu	Gln	Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Ser	Cys	Val	Arg	Leu	Val	Glu	Arg
1				5					10					15	
His	Arg	Ser	Ala	Trp	Cys	Phe	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu
			20				25						30		
Tyr	Leu	Val	Phe	Gly	Ala	Val	Val	Phe	Ser	Ser	Val	Glu	Leu	Pro	Tyr
		35				40						45			
Glu	Asp	Leu	Leu	Arg	Gln	Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu
	50					55					60				
Glu	Glu	His	Glu	Cys	Leu	Ser	Glu	Gln	Gln	Leu	Glu	Gln	Phe	Leu	Gly
65					70					75					80
Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Ser	Asn	Tyr	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Ser	Asn	Ala
				85					90					95	
Ser	Gly	Asn	Trp	Asn	Trp	Asp	Phe	Thr	Ser	Ala	Leu	Phe	Phe	Ala	Ser
		100						105					110		
Thr	Val	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Tyr	Gly	His	Thr	Val	Pro	Leu	Ser	Asp
		115					120					125			
Gly	Gly	Lys	Ala	Phe	Cys	Ile	Ile	Tyr	Ser	Val	Ile	Gly	Ile	Pro	Phe
	130					135					140				
Thr	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Ala	Val	Val	Gln	Arg	Ile	Thr	Val	His	Val
145					150					155					160

Thr	Arg	Arg	Pro	Val	Leu	Tyr	Phe	His	Ile	Arg	Trp	Gly	Phe	Ser	Lys	165	170	175
Gln	Val	Val	Ala	Ile	Val	His	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Phe	Val	Thr	Val	180	185	190
Ser	Cys	Phe	Phe	Phe	Ile	Pro	Ala	Ala	Val	Phe	Ser	Val	Leu	Glu	Asp	195	200	205
Asp	Trp	Asn	Phe	Leu	Glu	Ser	Phe	Tyr	Phe	Cys	Phe	Ile	Ser	Leu	Ser	210	215	220
Thr	Ile	Gly	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Pro	Gly	Glu	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	225	230	235
Phe	Arg	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Ile	Thr	Cys	Tyr	Leu	Leu	Leu	Gly	245	250	255
Leu	Ile	Ala	Met	Leu	Val	Val	Leu	Glu	Thr	Phe	Cys	Glu	Leu	His	Glu	260	265	270
Leu	Lys	Lys	Phe	Arg	Lys	Met	Phe	Tyr	Val	Lys	Lys	Asp	Lys	Asp	Glu	275	280	285
Asp	Gln	Val	His	Ile	Ile	Glu	His	Asp	Gln	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Ile	290	295	300
Thr	Asp	Gln	Ala	Ala	Gly	Met	Lys	Glu	Asp	Gln	Lys	Gln	Asn	Glu	Pro	305	310	315
Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Ala	Cys	Val	Asp	Gly	Pro	Ala	Asn	His	325	330	336

REVENDICATIONS

1) Molécule d'acide nucléique isolée et purifiée codant pour une protéine constituant un canal potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1.

2) Molécule d'acide nucléique isolée et purifiée codant pour une protéine constituant un canal potassium, caractérisée en ce qu'elle code pour la protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette séquence.

3) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 2, dont la séquence est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1.

4) Vecteur comprenant une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5) Procédé de production d'une protéine constituant un canal potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 consistant :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un vecteur selon la revendication 4, dans un hôte cellulaire,

- à cultiver l'hôte cellulaire obtenu à l'étape précédente dans des conditions permettant la production de canaux potassium présentant les propriétés de TWIK-1,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant des canaux potassium présentant des

propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1.

6) Procédé d'expression d'un canal potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 consistant :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un vecteur selon la revendication 4, dans un hôte cellulaire,

- à cultiver l'hôte cellulaire obtenu à l'étape précédente dans des conditions permettant l'expression de canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

8) Cellule exprimant des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 obtenue par le procédé selon les revendications 6 ou 7.

9) Procédé de criblage de substances capables de moduler l'activité des canaux potassium du type du canal TWIK-1, caractérisé en ce que :

- l'on met en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1 selon la revendication 8 , puis

- l'on mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants des canaux potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1.

10) Composition pharmaceutique pour compenser une déficience des canaux potassium au niveau de un ou plusieurs tissus, caractérisée en ce quelle comprend des molécules d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou un vecteur selon la revendication 4, ou encore des cellules selon la revendication 8.

11) Protéine isolée et purifiée constituant un canal potassium présentant des propriétés et une structure du type de celles du canal TWIK-1.

12) Protéine selon la revendication 11 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2, ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette séquence.

13) Composition pharmaceutique pour compenser une déficience des canaux potassium au niveau de un ou plusieurs tissus, caractérisée en ce quelle comprend une protéine selon l'une quelconque des revendications 11 et 12.

14) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre une protéine selon l'une quelconque des revendications 11 et 12.

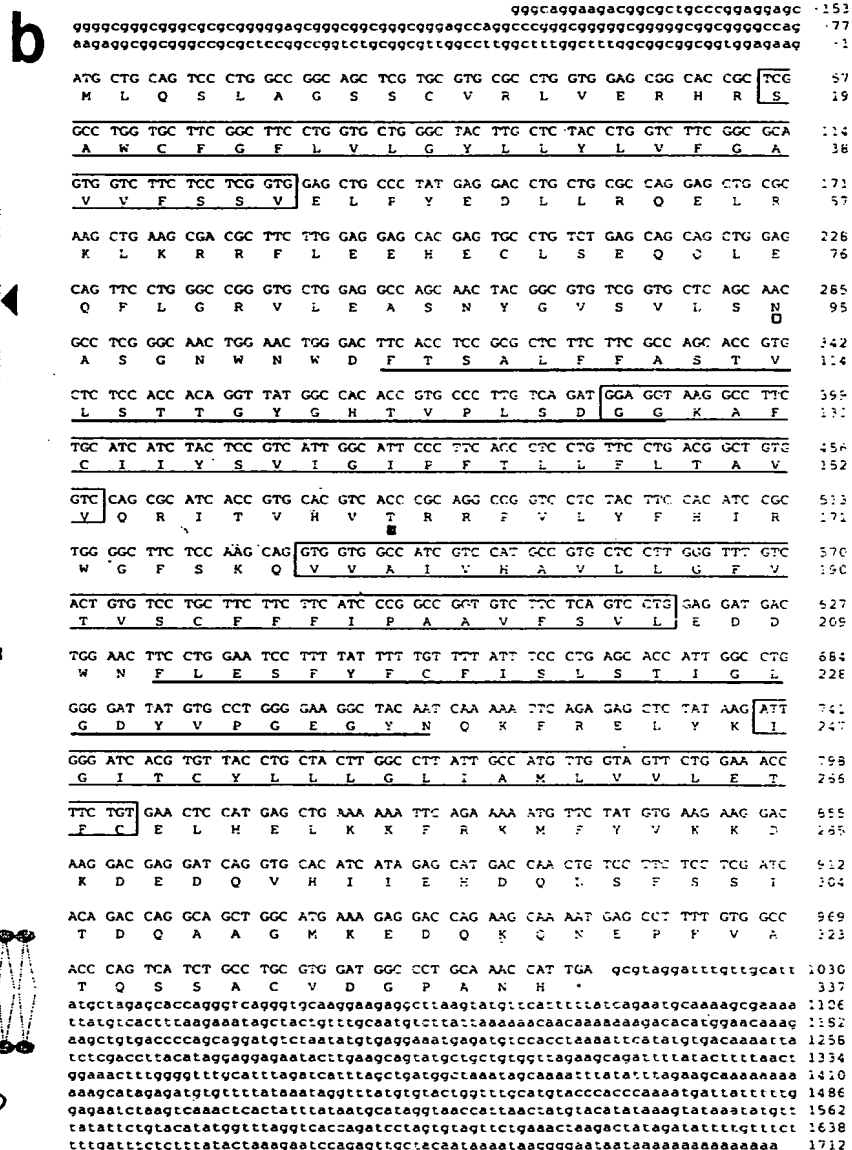
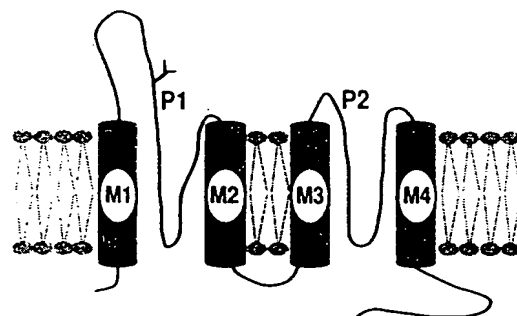


Fig. 2

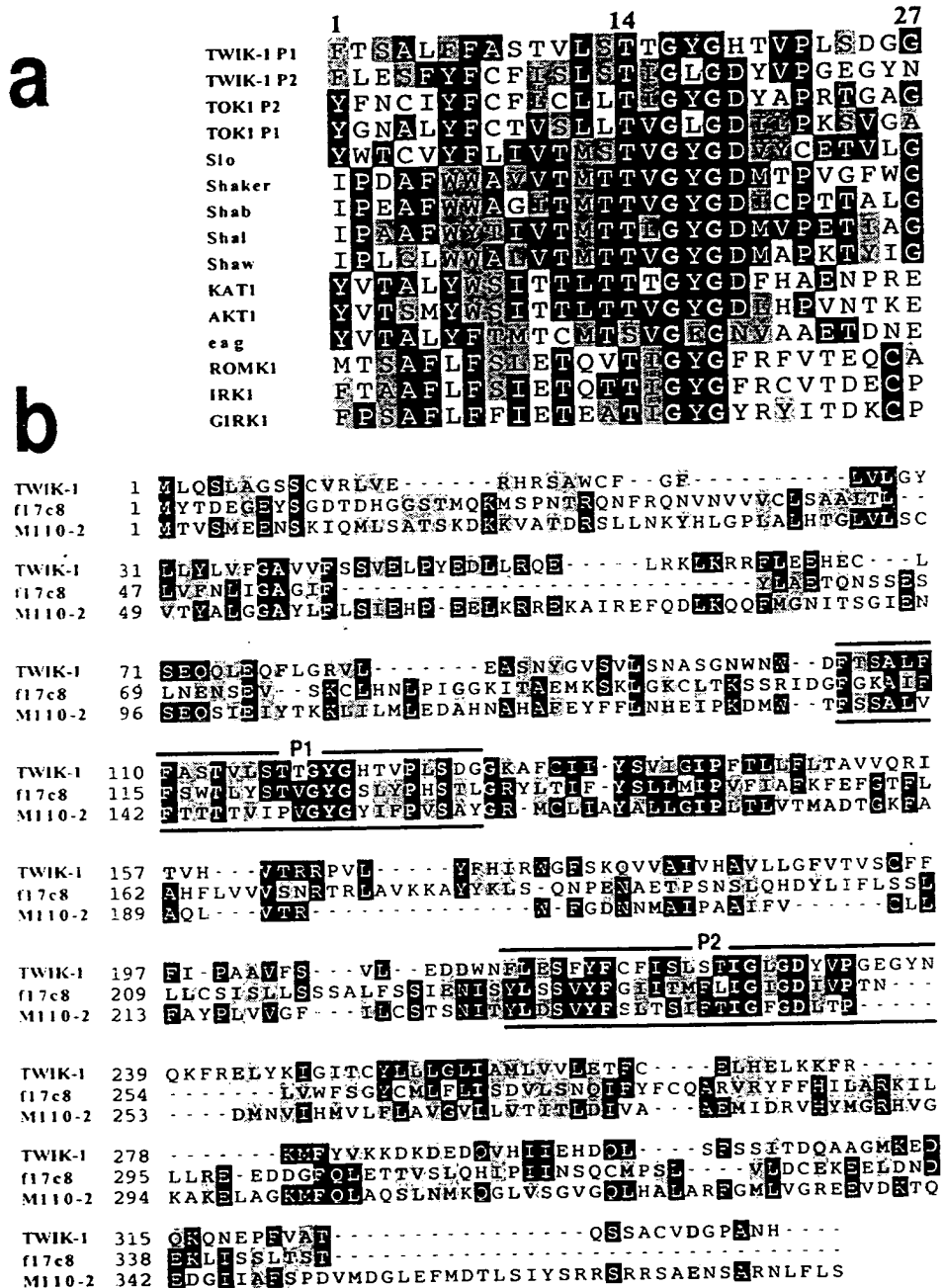


Fig. 3

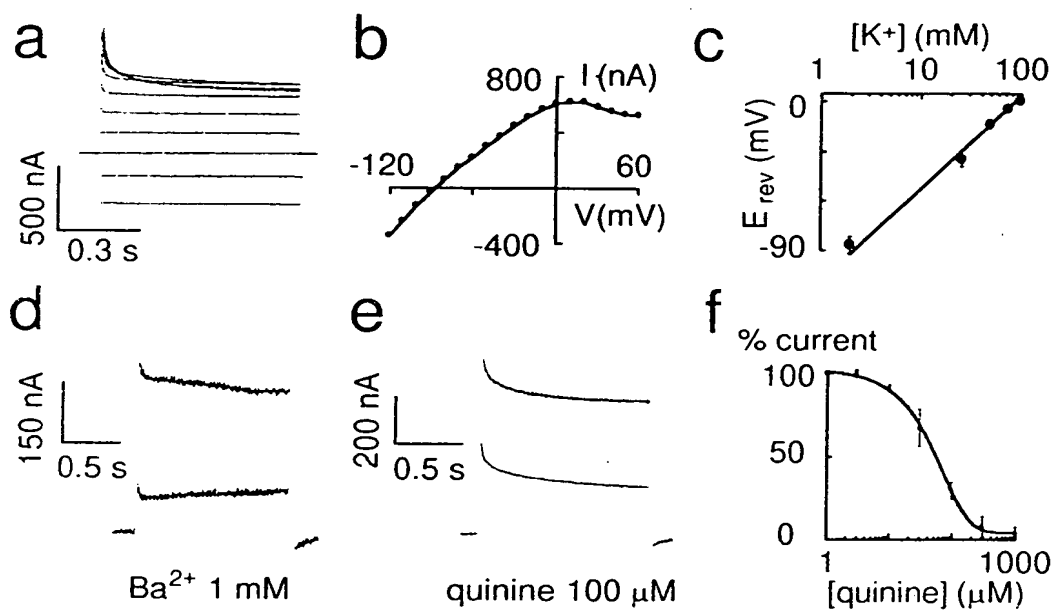


Fig. 4

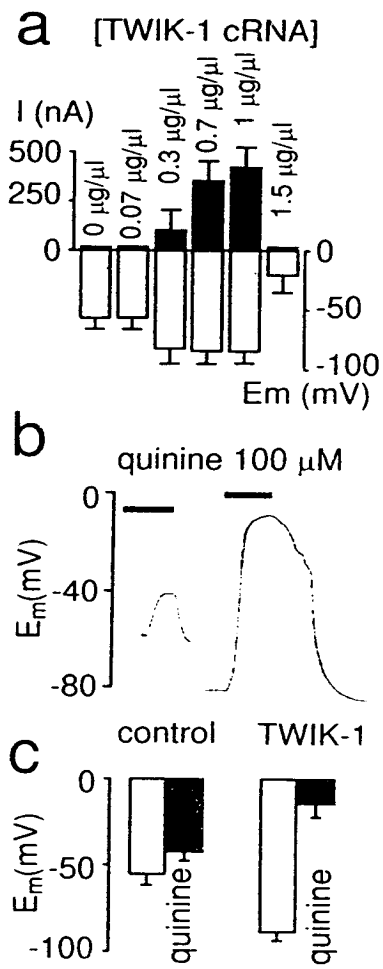


Fig. 5

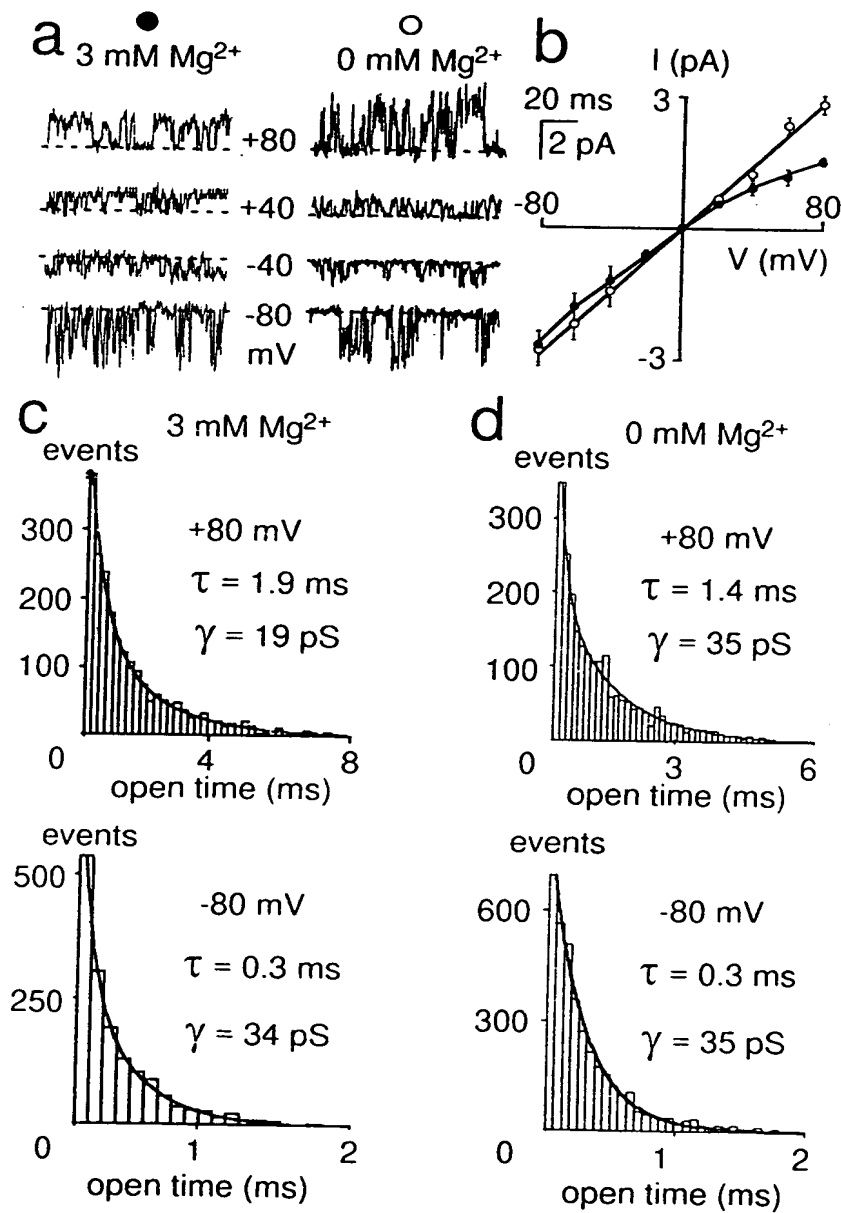


Fig. 6

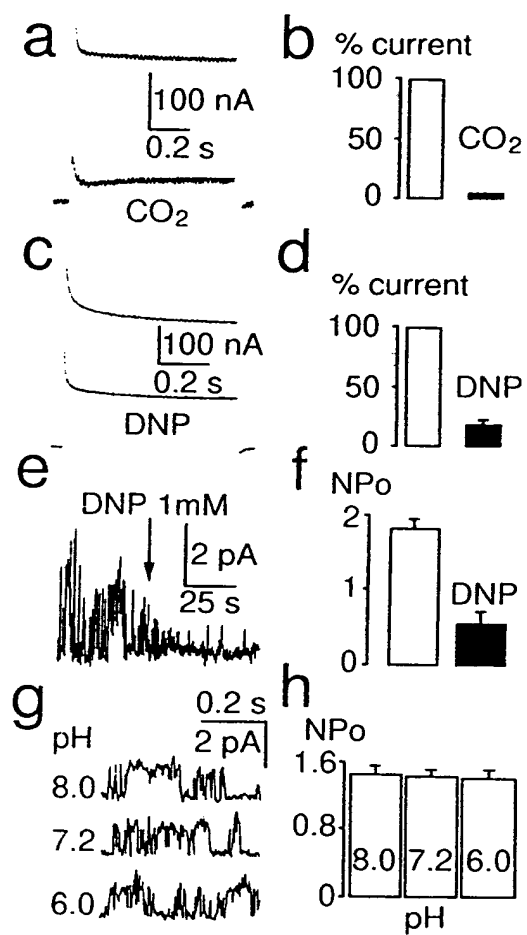
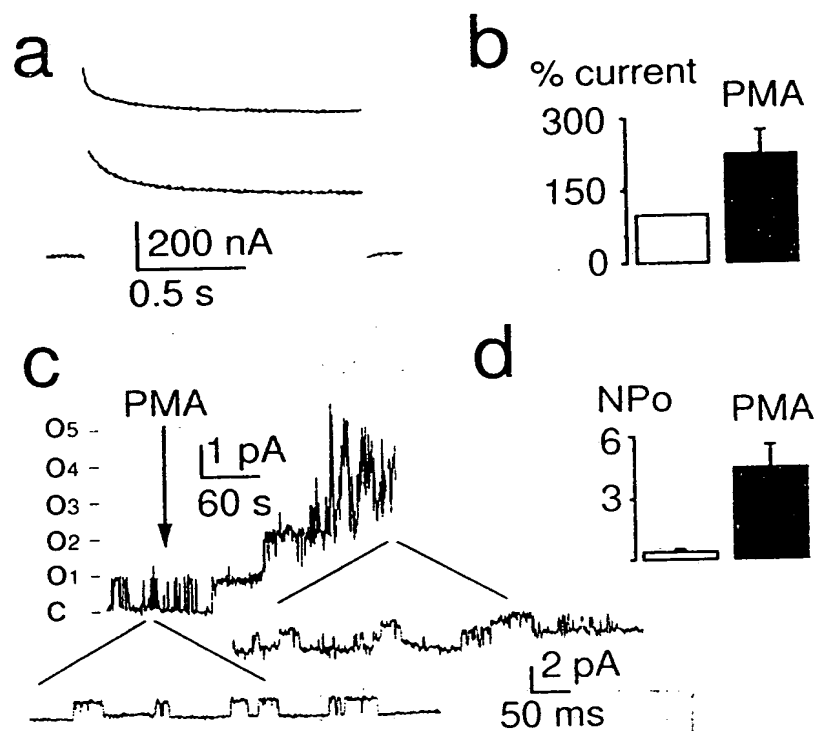


Fig. 7





RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☐ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.



1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
<p>NATURE, AUG 24 1995, 376 (6542) P690-5, ENGLAND, XP002017567 KETCHUM KA ET AL</p> <p>NATURE, SEP 15 1994, 371 (6494) P243-6, ENGLAND, XP002017568 LU Z ET AL</p> <p>WO-A-95 21943 (OREGON STATE) 17 Août 1995</p> <p>WO-A-94 28131 (CALIFORNIA INST OF TECHN) 8 Décembre 1994</p>	

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USP)